

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C08B 30/12, 37/00, A23L 1/308		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/02926 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Januar 2000 (20.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04129		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HR, HU, JP, KR, NO, PL, RU, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juni 1999 (15.06.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 30 618.0 9. Juli 1998 (09.07.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BENGs, Holger [DE/DE]; Bindingstrasse 3, D-60598 Frankfurt am Main (DE). JACOBASCH, Gisela [DE/DE]; Ahornstrasse 4, D-16348 Wandlitz (DE). SCHMIEDL, Detlef [DE/DE]; Gormannstrasse 20a, D-10119 Berlin (DE). RIESMEIER, Jörg [DE/DE]; Ludwigsfelderstrasse 18, D-14165 Berlin (DE). QUANZ, Martin [DE/DE]; Oppelner Strasse 34, D-10557 Berlin (DE). BÄUERLEIN, Michael [DE/DE]; Graefestrasse 9, D-10967 Berlin (DE). PROVART, Nicholas [DE/DE]; Parforieheide 31, D-14163 Berlin (DE).			
(54) Title: α -AMYLASE RESISTANT POLYSACCHARIDES, PRODUCTION METHOD AND USE THEREOF AND FOOD PRODUCTS CONTAINING SAID POLYSACCHARIDES			
(54) Bezeichnung: α -AMYLASE RESISTENTE POLYSACCHARIDE, HERSTELLUNGSVERFAHREN, VERWENDUNG UND LEBENSMITTEL MIT DIESEN POLYSACCHARIDEN			
(57) Abstract		The invention relates to a production method of α -amylase resistant polysaccharides with high RS content, comprising the following steps: a) producing a paste of water-insoluble poly-(1,4- α -D-glucan) and water; b) heating the paste; c) cooling off and retrogradation of the paste at a temperature that is lower than the temperature of the heated paste and d) optionally drying the resulting product.	
(57) Zusammenfassung		Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α -Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt, umfassend folgende Schritte: a) Herstellung eines Kleisters aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser; b) Erwärmung des Kleisters; c) Abkühlung des Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigen Temperatur; und d) ggf. Trocknung des erhaltenen Produktes.	

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	MN	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

α -Amylase resistente Polysaccharide, Herstellungsverfahren, Verwendung und Lebensmittel mit diesen Polysacchariden

5 Beschreibung

Der Einsatz resistenter Stärken (RS) hat für die Lebensmittelindustrie eine zunehmend größere Bedeutung. Aus dem Abbau von RS-Produkten gewinnt der Organismus nur in geringem Umfang Energie. Diese Energiezufuhr bezieht sich ausschließlich auf den oxidativen Abbau resorbierter kurzkettiger Fettsäuren aus dem Dickdarm. Diese kurzkettigen Fettsäuren sind Endprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels der intestinalen Mikroflora. Mit der Aufnahme RS-haltiger Lebensmittel sind zwei Funktionen verknüpft, Substratbereitstellung für den Energiestoffwechsel der intestinalen Mikroflora und den der Dickdarmepithelzellen. Letztere sind zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion auf eine luminale Zufuhr der kurzkettigen Fettsäuren und insbesondere von Butyrat angewiesen.

Seit langem ist bekannt, daß der Gehalt an hochverzweigtem Amylopektin in Stärken, die gewöhnlich aus Amylose und Amylopektin variierender Zusammensetzung bestehen, durch gezielte enzymatische Behandlung reduziert wird, wodurch der Anteil an kurzkettigen Amylosestrukturen erhöht werden kann (US Patent 3,729,380). Es ist ebenfalls bekannt, daß derartige Produkte eine stärkere Tendenz zur Retrogradation als native Stärken besitzen. Bei diesem Prozeß bilden sich sogenannte (α -amylaseresistente Stärkestrukturen aus. Als resistente Stärke (RS) werden Kohlenhydratpolymere bezeichnet, die durch (α -Amylase nicht abgebaut werden. Sie stellen dadurch eine energiereduzierte, körpergebende Komponente in Lebensmittelzusammensetzungen im Sinne eines Ballaststoffes dar. Die Behandlung mit entzweigenden Enzymen findet aus technischen Gründen gewöhnlich in einem nicht zu konzentrierten wässrigen Stärkekleister statt.

EP 0 564 893 A1 beschreibt und beansprucht einen Prozeß für die Herstellung eines RS-Produktes, das bis zu 15 % RS enthält. Dieser Prozeß ist dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Suspension einer Stärke, die mindestens 40 % Amylose enthält, verkleistert und enzymatisch durch Behandlung mit einem Enzym, das die α -1, 6-glykosidischen Bindungen öffnet, entzweigt und anschließend das entstandene Zwischenprodukt retrogradiert wird. Nach EP 0 564 893 A1 liegt die optimale Stärkekonzentration in der Suspension bei 15 % und die Beispiele dieser EP-Patentanmeldung illustrieren den Prozeß, wenn die Stärkekonzentrationen entweder auf 14 % reduziert bzw. auf 17 % erhöht werden. Das Ausgangsmaterial enthält mindestens 40 % Amylose und ist eine Maisstärke. Es wird weiterhin gezeigt, daß bei einem Amylosegehalt von 25 % durch diesen Prozeß keine resistente Stärke (RS) gebildet wird. Außerdem wird nachgewiesen, daß bei Erhöhung des Amylosegehaltes über 40 % auf bis zu 100 % ein Produkt erzeugbar ist, daß bis zu 50,3 % RS enthält.

EP 0 688 872 A1 beschreibt und beansprucht einen Prozeß für die Herstellung eines RS-haltigen Produktes, das 25 bis 50 Gew.-% an RS enthält. Entsprechend den Angaben beschreibt und beansprucht EP 0 688 872 A1 einen Prozeß für die Herstellung eines RS-haltigen Produktes, in dem eine wässrige Suspension einer partiell abgebauten, verkleisterten Stärke enzymatisch entzweigt und das Zwischenprodukt retrogradiert wird.

(In diesem Zusammenhang wird als "partiell abgebaut Stärke" ein Polymer verstanden, das durch geeignete Behandlung im Molekulargewicht reduziert wurde, wobei die Verkürzung der Kettenlänge sowohl die Amylose als auch das Amylopektin betrifft. Die Degradation schließt sowohl Hydrolyseprozesse (säure- oder enzymkatalysierte) als auch Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse ein.)

Besonders hervorgehoben werden säureabgebaut Wurzel- oder Knollenstärken sowie Maltodextrine von Wurzel- oder Knollenstärken. Maltodextrine sind durch einen DE-Wert (DE: Dextrose Equivalent) im Bereich von 1 bis 19 charakterisiert.

Sie werden aus Kartoffel- oder Tapiokastärke, die bis zu 25 % Amylose enthalten, hergestellt. Die wässrige Suspension solcher Maltodextrine enthält für den Prozeß einen Feststoffanteil von 20 Gew.-% oder mehr. Die Maltodextrine sind weiterhin dadurch charakterisiert, daß sie hohe Gehalte an Oligomeren mit

5 Polymerisationsgraden kleiner als 10 (DP < 10) von bis zu 22 Gew.-% enthalten sowie ein mittleres Molekulargewicht von $1,3680 \times 10^4$ g/mol. Die entzweigenden Enzyme, die für den bekannten Prozeß genutzt werden, sind Pullulanase und Isoamylase. Am Ende der enzymatischen Behandlung wird eine Retrogradation in einem Temperaturbereich von 0 bis 30 °C in einem Zeitintervall von 1 bis zu 3

10 Tagen durchgeführt, in dem man das wässrige Reaktionsprodukt stehen läßt. Anschließend wird das Produkt durch Sprühtrocknung getrocknet. Es wird ein pulverförmiges Produkt mit einem RS-Gehalt bis zu maximal 60 Gew.-% hergestellt.

15 Die Erfindungsbeschreibung dient dem Ziel, Kohlenhydratpolymere mit einem hohen Anteil resistenter, relativ thermostabiler Strukturen ökonomisch herzustellen, um sie in der Lebensmittelherstellung einsetzen zu können.

20 So betrifft eine Ausführungsform der Erfindung α -Amylase-resistente Polysaccharide, die Poly-(1,4- α -D-glukane) sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% aufweisen.

25 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter einem RS-Gehalt den Gehalt an α -Amylase-resistenten Polysacchariden, wie er nach der Methode von Englyst et al. (Classification and measurement of nutritionally important starch Fractions, European Journal of Clinical Nutrition, 46 (Suppl. 23) (1992) 33-50) bestimmt werden kann; s. auch Beispiel 3.

30 Die erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharide können gekennzeichnet sein durch einen RS-Gehalt von mindestens 75 und insbesondere mindestens 95 Gew.-%.

Ferner können die erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß die Poly-(1,4- α -D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.

- 5 So können die Poly- (1,4- α -D-glukane) durch Veretherung oder Veresterung in 2-, 3- oder 6-Position chemisch modifiziert worden sein. Der Fachmann ist mit chemischer Modifizierung hinlänglich vertraut; vgl. beispielsweise folgende Literatur:
1. Functional Properties of Food Components, 2nd edition, Y. Pomeranz, Academic Press (1991).
 - 10 2. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Belitz & Grosch, Springer Verlag (1992).
 3. Citrat Starch Possible Application as Resistant Starch in Different Food Systems, B. Wepner et al., European Air Concerted Action, Abstract: air3ct94-2203, Functional Properties of Non-digestible Carbohydrates, Pro Fibre-Tagung, Lissabon, Februar 1998, Seite 59.
- 15 Ferner können die erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß sie in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5 % aufweisen.
- 20 Ferner können die erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß sie in 2- und/oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1,0 % und insbesondere höchstens 0,5 % aufweisen.
- 25 Ferner können die α -Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß die Poly-(1,4- α -D-glukane) ein Molekulargewicht von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7 , bevorzugt 10^3 bis 10^6 und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 g/mol aufweisen und/oder wasserunlöslich sind.
- 30 Ferner können die erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharide dadurch gekennzeichnet sein, daß die Poly-(1,4- α -D-glukane) weder entzweigt,

insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichtes) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

5

Ferner können die erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharide nach einem Verfahren erhältlich sein umfassend folgende Schritte:

- a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
- b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
- c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
- d) ggf. Trocknung des erhaltenen Produktes.

15

Unter dem Begriff "wasserunlöslich" versteht man Verbindungen, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft/Stuttgart & Gori-Verlag/Frankfurt, 9. Aufl., 1987; s. auch Beispiele 22 bis 23) unter die Kategorie "schwer lösliche" Verbindungen, "sehr schwer lösliche" oder "praktisch unlösliche" Verbindungen fallen.

20

Der Fachmann ist mit den Begriffen "Suspension" und "Dispersion" vertraut. Ergänzend sei verwiesen auf Römpf, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart & New York, Seiten 4401 bzw. 1010.

25

Der Fachmann ist ferner mit dem Begriff "Kleister" vertraut. Ergänzend sei verwiesen auf Römpf, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart & New York, Seite 2256.

30

Ferner können die erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharide nach einem Verfahren erhältlich sein umfassend folgende Schritte:

- a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
- b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;
- c) Retrogradation;
- 5 d) Auftauen der nach Schritt c) erhaltenen Masse; und
- e) ggf. Trocknung der nach Schritt d) erhaltenen Masse oder Entwässerung der erhaltenen Masse.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α -Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend 10 folgende Schritte:

- a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
- b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
- c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer 15 gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
- d) ggf. Trocknung des erhaltenen Produktes.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens kann darin bestehen, daß aus den 20 oben beschriebenen Ausgangsstoffen ein wässriger heißer Kleister herstellbar ist, der bis zu beispielsweise 30 Gew.-% oder mehr Feststoffanteile enthält, ohne daß beispielsweise eine Entzweigung oder ein partieller Abbau bzw. eine Kettenlängenreduktion der verwendeten Ausgangsstoffe vorgenommen werden 25 muß. Dies führt zu einer Vereinfachung der Prozeßführung und damit zu einer Reduzierung der Kosten des Verfahrens, weil der zeit- und kostenaufwendige Einsatz entzweigender Enzyme bzw. degradierender Chemikalien entfällt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei 30 Schritt (a) einen Kleister mit einem Polysaccharid-Gehalt von mindestens etwa 5 und bis zu etwa 30, 35, 40, 45 oder 50 Gew.-% herstellt.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (b) den Kleister auf eine Temperatur im Bereich von Raumtemperatur, 50, 60 oder 70 bis 100 °C erwärmt oder erhitzt.

- 5 Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (c)
- (i) bei einer Temperatur im Bereich von 50 °C bis an den Gefrierpunkt, vorzugsweise 35 bis 15 °C, 27 bis 22 °C, 16 bis 0 °C oder 6 bis 2 °C und/oder
 - 10 (ii) für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, vorzugsweise 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h retrogradiert.

Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (c) nach einem Temperaturstufenprogramm

- 15 (i) in einem Temperaturbereich von 100 bis 0 °C und vorzugsweise 90 bis 4 °C
- (ii) für ein Gesamtzeitintervall von 8 bis 36 h, vorzugsweise 20 bis 28 h und insbesondere 22 bis 26 h gemäß dem folgenden Temperatur-Zeit-20 Programm stufenweise und gegebenenfalls unter Einwirkung von Scherkräften abkühlt und retrogradiert, wobei sich die gewählten Zeitintervalle zu einem vorstehend angegebenen Gesamt-Zeitintervall ergänzen:

Temperatur-Zeit-Programm	
Temperatur (°C)	Zeitintervall
90 ± 10	5 min ± 5 min
80 ± 10	10 min ± 10 min
70 ± 10	(30 bis 180 min) ± 30
40 ± 10	(60 bis 180 min)

	± 60 min
25 ± 10	22 h ± 15 h
4 ± 10	20 h ± 15 h

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von α -Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend folgende Schritte:

- 5 a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
- b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;
- c) Retrogradation;
- d) Auftauen der nach Schritt c) erhaltenen Masse; und
- 10 e) ggf. Trocknung der nach Schritt d) erhaltenen Masse oder Entwässerung der erhaltenen Masse.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dadurch gekennzeichnet sein, daß man die gemäß Schritt (d) aufgetaute Masse noch einmal oder mehrmals den Schritten (b) bis (d) unterwirft, bevor man endgültig auftaut, trocknet oder entwässert.

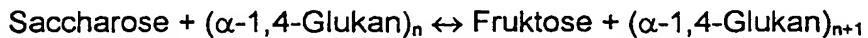
Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (b) die erhaltene Suspension oder Dispersion auf eine Temperatur im Bereich 0 °C bis 80 °C abkühlt.

20 Ferner kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Schritt (c) für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, bevorzugt 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h retrogradiert.

25 Die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens können dadurch gekennzeichnet sein, daß man bei Stufe (a) von Poly-(1,4- α -D-glukanen) ausgeht, die aus Biotransformation, aus Umsetzung mit Enzymen oder aus Umsetzung von

Saccharose mit einem Enzym der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen worden sind; vgl. beispielsweise WO 95 31 553.

Unter einer Amylosucrase versteht man ein Enzym, das die folgende Reaktion 5 katalysiert:



Ausgehend von diesem Reaktionsschema können lineare oligomere oder polymere 10 α -1,4-Glukane als Akzeptoren für eine kettenverlängernde Reaktion dienen, die zu wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) führt, deren Glukoserest durch α -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind und die ein Molekulargewicht im Bereich von $0,75 \times 10^2$ g/mol bis 10^7 g/mol aufweisen.

15 Die linearen oligomeren oder polymeren Akzeptoren können dabei entweder von außen zugesetzt werden, sie können jedoch auch, wie in Beispiel 1 beschrieben, durch die Amylosucrase selbst aus Saccharose erzeugt werden.

20 α -1,6-glykosidische Bindungen sind in diesen Produkten per ^{13}C -NMR nicht nachweisbar (Remaud-Simeon et al. in Carbohydrate Bioengineering (ed. S. B. Petersen et al.), Elsevier Science B.V. (1995), 313-320).

Auch wasserunlösliche Poly-(1,4- α -D-glukane), die die eben beschriebenen 25 Eigenschaften aufweisen, aber auf anderem Wege erzeugt worden sind, können Ausgangsstoffe des erfindungsgemäßen Verfahrens sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens 30 verwendet man wasserunlösliche Poly-(1,4- α -D-glukane) als Ausgangsstoffe, die durch die Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym mit der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase unter Einsatz von verzweigten Polysaccharidakzeptoren, wie z. B. Glykogen, Amylopektin, Dextrin, gewonnen werden können. Die Amylosucrase katalysiert eine α -1,4-Glukankettenverlängerung

an diesen verzweigten Polysaccharidakzeptoren. Die dabei entstehenden wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) weisen im Vergleich zu den eingesetzten verzweigten Polysaccharidakzeptoren einen geringeren Verzweigungsgrad auf. Auch diese Produkte werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Poly-(1,4- α -D-glukane) bezeichnet.

5 Auch solche wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane), die die eben beschriebenen Eigenschaften aufweisen, aber auf anderem Wege erzeugt worden sind, können Ausgangsstoffe des erfindungsgemäßen Verfahrens sein.

10 Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.

15 Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5 % aufweisen.

20 Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) in 2- oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1 % und insbesondere höchstens 0,5 % aufweisen.

25 Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) ein Molekulargewicht von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7 , bevorzugt 10^3 bis 10^6 g/mol und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 aufweisen.

30 Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch gekennzeichnet sein, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichts) reduziert worden sind,

insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

Unter dem Begriff "hoher RS-Gehalt" versteht man einen RS-Gehalt von mindestens 5 25 %, bevorzugt von 65 bis 75, 75 bis 88, 88 bis 90, 90 bis 95 und insbesondere 95 bis 99 oder mehr Gew.-%.

So können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch 10 gekennzeichnet sein, daß man α -Amylase-resistente Polysaccharide mit einem RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% gewinnt.

Ferner können die Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens dadurch 15 gekennzeichnet sein, daß man bei den Trocknungsschritten (e) bzw. (d) das retrogradierte Produkt durch Sprüh- oder Gefriertrocknung trocknet.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Verwendung eines 20 erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharids für Lebensmittel-Vorprodukte oder Lebensmittel.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Verwendung eines 25 erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharids als Lebensmitteladditiv oder Lebensmittelzusatzstoff.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung ein Lebensmittel-Vorprodukt oder Lebensmittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem 25 erfindungsgemäßen α -Amylase-resistenten Polysaccharid.

Die folgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, ohne diese auf die Beispiele zu begrenzen.

Beispiel 1: Biotransformation

In einem 5-l-Gefäß werden 5 l einer sterilisierten 30-proz. Saccharose Lösung gegeben. Ein Enzymextrakt, der eine Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* enthält (s. WO 95 31 553), wird in einer Portion zugegeben und gemischt. Die eingesetzte Enzymaktivität beträgt in diesem Experiment 148000 Units. Das verschlossene Gefäß wurde bei 37 °C inkubiert. Während der Dauer der Biotransformation bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wird nach 39 h beendet. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, bei -70 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Masse des gefriergetrockneten Feststoffes beträgt 526,7 g (70,2 % Ausbeute).

Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker werden 200 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wird nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay¹ bestimmt und beträgt 4,61 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff (4,6%). Der Gehalt an Saccharose liegt unter der Nachweisgrenze.

Der Überstand der Biotransformation wird bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei -70 °C eingefroren und über 3 Tage bei 4 °C aufgetaut. Der so erzeugte Niederschlag wurde bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker werden 39,5 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wird nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay gemäß STITT et al. (Meth. Enzym., 174 (1989) 518 - 552) bestimmt und beträgt 2,27 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff. Der Gehalt an Saccharose liegt unter der Nachweisgrenze.

Beispiel 2: Ausgangsmaterial

Bestimmung des Molekulargewichts des mit Amylosucrase synthetisierten wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukans) aus Beispiel 1 (Figur 1)

- 5 Es werden 2 mg des Poly-(1,4- α -D-glukans) aus Beispiel 1 bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert (2 μ m). Ein Teil der Lösung wird in eine Säule der Gelpermeationschromatographie infiziert. Als Elutionsmittel wird DMSO verwendet. Die Signalintensität wird mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1.0 ml pro Minute.
- 10

Die Messung ergibt ein Zahlenmittel des Molekulargewichts (M_n) von 2.326 g/mol und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts (M_w) von 3.367 g/mol. Die Wiederfindungsrate beträgt 100 %.

15

Beispiel 3

Beispiel zur Bestimmung des RS-Gehaltes.

- 200 mg (Trockengewicht) eines auf seinen RS-Gehalt zu analysierenden
20 pulverförmigen Produktes wurden nach der Methode von Englyst et al. (Eur. J. Clin. Nutrition, 46 (1992) (Suppl. 2) S 33-550) zur Bestimmung des RS-Gehaltes mit der beschriebenen Enzymmischung bei pH 5,2 120 min inkubiert. Nach Beendigung des enzymatischen Abbaus wurde die Aktivität der Enzyme durch Erniedrigung des pH-Wertes auf einen Wert von 3 und der Temperatur auf 20 °C gestoppt. Anschließend erfolgte durch Zugabe der 4-fachen Menge an Ethanol die Einstellung einer 80-proz. (v/v) ethanolischen Lösung. Die 80-proz. ethanolische Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (2500 x g, 10 min) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde dreimal mit 80-proz. (v/v) Ethanol und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Der Rückstand wurde lyophilisiert und gewogen. Die Trockenmasse des Rückstandes wurde bestimmt und der RS-Gehalt nach folgender Gleichung berechnet:

RS [%] = 100 x Gewicht des Rückstandes (Trockengewicht)/Einwaage
(Trockengewicht)

Beispiele 4 bis 7

5 Ein lineares, naturidentisches Poly-(1,4- α -D-glukan) (siehe Beispiel 1) wurde in
wässriger Lösung erhitzt und ein Kleister gebildet. Dieser Kleister wurde auf 10
Gew.-% Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei 4 und
25 °C (Beispiel 5 bzw. 6) oder mit Hilfe eines Stufenprogramms (Beispiel 7)
retrogradiert. Des weiteren wurde das lineare Kohlenhydratpolymer aus dem
10 Reaktionsansatz ausgefroren (Beispiel 4). Die retrogradierten Muster wurden
getrocknet und die Bestimmung des RS-Gehaltes wie oben beschrieben
durchgeführt.

15 Tabelle 2 illustriert den Einfluß der Retrogradationstemperatur und -bedingungen
auf den RS-Gehalt im Produkt, hergestellt aus einem 10-proz. Kleister der
verwendeten Poly-(1,4- α -D-glukane) durch 24-stündige Retrogradation.

Tabelle 2

Beispiel	Retrogradationstemperatur	RS [Gewicht-%]
4	-70 °C	78 ± 4
5	4 °C	70 ± 2
6	25 °C	87 ± 1
7	Stufenprogramm	74 ± 3

25 Dieses Beispiel in Tabelle 2 zeigt, daß die Retrogradationstemperatur den RS-
Gehalt beeinflußt. So führt eine Retrogradation bei 25 °C zu einem deutlich höheren
RS-Anteil verglichen mit einer Retrogradation bei 4 °C. Durch Retrogradation bei -
70 °C erhält man hingegen einen leicht höheren RS-Anteil verglichen mit dem nach
Retrogradation bei 4 °C. Das Ausgangsprodukt verhält sich dementsprechend
30 anders als Maltodextrine, wie sie in EP 0 688 872 A1 beschrieben und beansprucht
werden.

Beispiele 8 bis 12

Das gleiche wie unter Beispielen 4 bis 7 verwendete Poly-(1,4- α -D-glukan) wurde in wässriger Lösung erhitzt, um einen Kleister zu bilden. Dieser wurde auf 10 und 30 Gew.-% Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei 4 und 25 °C oder mit Hilfe eines Stufenprogramms retrogradiert. Tabelle 3 illustriert den Einfluß des Feststoffanteils im Kleister auf den RS-Gehalt im Produkt, hergestellt aus 10 und 30-proz. Kleister des verwendeten Poly-(1,4- α -D-glukans) durch 24-stündige Retrogradation.

Tabelle 3

Beispiel	Retrogradationstemperatur	Feststoffanteil	10 % RS [Gewicht-%]	30 % RS [Gewicht-%]
8	4 °C	70 ± 2		
9	4 °C			94 ± 2
10	25 °C	87 ± 1		
11	25 °C			93 ± 1
12	Stufenprogramm	74 ± 3		

Dieses Beispiel in Tabelle 3 zeigt, daß der Feststoffanteil im Kleister den RS-Gehalt beeinflußt. So führt eine Retrogradation bei 30 % Feststoffanteil zu einem deutlich höheren RS-Gehalt im Produkt verglichen mit einer Retrogradation bei einem 10-proz. Feststoffanteil. Das Ausgangsprodukt verhält sich dementsprechend anders als Maltodextrine, wie sie in EP 0 688 872 A1 beschrieben und beansprucht werden.

Beispiele 13 bis 21

Das gleiche wie unter Beispielen 4 bis 7 verwendete Poly-(1,4- α -D-glukan) wurde in wässriger Lösung erhitzt, um einen Kleister zu bilden. Dieser wurde auf 10 bzw. 30 Gew.-% Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei -70, 4 und 25 °C retrogradiert. Danach wurden die erhaltenen Produkte getrocknet und die

thermische Stabilität mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht.

Die DSC-Messung liefert für die Quellung von nativer Stärke einen endothermen Peak. Ahnliches trifft auch für retrogradierte Stärken und Poly-(1,4- α -D-glukane) zu. An Hand von Endothermen lassen sich die Vorgänge des Schmelzens der Kristallite, der Konformationsänderung sowie der Hydratation und Quellung von Stärkepolymeren charakterisieren.

Messungen unter der Bedingung des Wasserüberschusses (Wassergehalte über 60 %) ergeben in der Regel einen einheitlichen Peak. Dieser Peak ist durch verschiedene Parameter, wie on set-Temperatur T_0 , Peaktemperatur T_p , Endtemperatur T_c , sowie Reaktionsenthalpie ΔH (Fläche des Peaks) charakterisiert. Die o. g. Bedingung ist für alle in Tabelle 4 aufgeführten Parameter erfüllt.

Die Messungen wurden mit einem hochauflösenden Gerät (DSC120, Fa. Seiko, Japan) durchgeführt. Das Glukan/Wasser-Verhältnis betrug 1:5, die Heizrate 4 K/min. Die Messung wurde in einem Temperaturbereich von 10 bis 220 °C durchgeführt. Das Gerät arbeitet nach dem Heat Flux-Meßprinzip. Pro Messung wurden 5 mg Polyglukan mittels Ultra-Mikrowaage in Silbertiegel von 70 μ l Fassungsvermögen eingewogen und diese nach Zugabe von destilliertem Wasser anschließend hermetisch verschlossen. Als Referenzprobe wurde destilliertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,15 μ S verwendet,

Tabelle 4

Bezeichnung	Retrogradations- bedingungen	DSC-Parameter			
		Temperatur/Fest- stoffanteil im	T_0 [°C]	T_p [°C]	T_c [°C]
5	Beispiel	Kleister			
13	Tieftemperatur- rekristallisation	85,1	102,0	111,3	21,8
14	4 °C, 10 %	81,8	96,7	108,0	16,3
10	15 4 °C, 30 %	86,2	98,2	103,7	1,8
16		109,3	124,5	136,8	13,3
17		142,7	154,1	165,6	2,9
18	25 °C, 10 %	88,6	101,0	109,8	15,0
19	25 °C, 30 %	85,9	97,9	101,1	1,7
15	20	111,8	126,1	133,9	4,0
20		138,1	157,6	172,5	23,0

Diese Beispiele in Tabelle 4 zeigen, daß der Feststoffanteil im Kleister die thermische Stabilität der retrogradierten Produkte beeinflußt. So führt eine 20 Retrogradation bei 30 % Feststoffanteil im Kleister zu Produkten, die in DSC-Messungen Endothermen mit mehr als einem Peak zeigen, wobei Peaktemperaturen (T_p) in diesen Endothermen von > 120 °C auftreten. Hingegen führt die Retrogradation 10-proz. Kleister zu Produkten, deren Endothermen nur einen Peak mit T_p -Werten zwischen 95 und 100 °C aufweisen. Die Erhöhung des 25 Feststoffanteils im Kleister bewirkt somit eine Erhöhung der thermischen Stabilität des retrogradierten Produktes.

Beispiel 22

Bestimmung der Löslichkeit von Polysacchariden und Klassifizierung nach 30 Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

564 mg Poly-(1,4- α -glukan) (siehe Beispiel 1) werden in ca. 0,5 l bidestilliertem Wasser bei 1,3 bar und 130 °C für 1,5 Stunden in einem Autoklaven erhitzt (Apparat Certoclav). Von dem Reaktionsgefäß ist zuvor das Gewicht gemessen worden. Danach wird die Apparatur entspannt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Inhalt wird gewogen. Er entspricht 501,74 g. Nach weiteren 24 Stunden wird zentrifugiert und dekantiert. Der feste Rückstand wird getrocknet und ausgewogen. Es sind 468 mg. Daraus errechnet sich ein gelöster Anteil von 96 mg. Bezogen auf das eingesetzte Lösungsmittel errechnet sich daraus, daß für 1 mg Poly-(1,4- α -glukan) 5226 mg Wasser notwendig sind. Gemäß der Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch ergibt sich daraus die Einteilung, daß diese Substanz "sehr schwer löslich" ist, da zwischen 1.000 und 10.000 Teilen Lösungsmittel notwendig sind, um 1 Teil der Substanz in Lösung zu bringen. Dies ist von den 7 Klassen zur Einteilung der Löslichkeit (von "sehr leicht löslich" (Klasse 1) bis "praktisch unlöslich" (Klasse 7) die Klasse Nummer 6.

15

Beispiel 23

Bestimmung der Löslichkeit von Polysacchariden und Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

20

Der Versuch wird wie in Beispiel 22 durchgeführt. Der einzige Unterschied bildet ein Kühlprozeß, der nach der Autoklavbehandlung und dem Abkühlen auf Raumtemperatur nachgeschaltet wird. Das Substanzgemisch wird für 3 Stunden bei 5 °C aufbewahrt.

25

Es werden 526 mg Poly-(1,4- α -glukan) auf ca. 480 ml bidestilliertem Wasser eingewogen. Nach der thermischen Behandlung ergibt sich eine Auswaage von 468,09 g. Das getrocknete Sediment beträgt 488 mg. Demnach sind 38 mg des Poly-(1,4- α -glukans) in Lösung gegangen. Dies entspricht einem Verhältnis von 1 mg Substanz zu 12.305 Teilen Lösungsmittel. Demnach ist die Substanz nach dieser Behandlungsmethode in Klasse Nummer 7 nach DA.B einzustufen und

danach als praktisch unlöslich zu klassifizieren, weil mehr als 10.000 Teile Lösungsmittel für ein Teil Substanz benötigt werden.

Patentansprüche

1. α -Amylase-resistente Polysaccharide, die Poly-(1,4- α -D-glukane) sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% aufweisen.
2. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen RS-Gehalt von mindestens 75 und insbesondere mindestens 95 Gew.-%.
3. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Poly-(1,4- α -D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.
4. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5 % aufweisen.
5. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in 2- und/oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1,0 % und insbesondere höchstens 0,5 % aufweisen.
6. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Poly-(1,4- α -D-glukane) ein Molekulargewicht von $0,75 \times 10^2$ bis 10^7 , bevorzugt 10^3 bis 10^6 und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 g/mol aufweisen.
7. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Poly(1,4- α -D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer

Kettenlänge (und damit hinsichtlich ihres Molekulargewichtes) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

- 5 8. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der vorhergehenden Ansprüche, erhältlich nach einem Verfahren umfassend folgende Schritte:
 - a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
 - b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
 - 10 c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und
 - d) ggf. Trocknung des erhaltenen Produktes.
- 15 9. α -Amylase-resistente Polysaccharide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, erhältlich nach einem Verfahren umfassend folgende Schritte:
 - a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
 - b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;
 - 20 c) Retrogradation;
 - d) Auftauen der nach Schritt c) erhaltenen Masse; und
 - e) ggf. Trocknung oder Entwässerung der nach Schritt d) erhaltenen Masse.
- 25 10. Verfahren zur Herstellung von α -Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend folgende Schritte:
 - a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
 - b) Erwärmung der Suspension oder Dispersion;
 - c) Abkühlung des erhaltenen Kleisters und Retrogradation des Kleisters bei einer gegenüber der Temperatur des erhitzten Kleisters erniedrigten Temperatur; und

- d) ggf. Trocknung oder Entwässerung des erhaltenen Produktes.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (a) gemäß Anspruch 10 einen Kleister mit einem Polysaccharid-Gehalt von mindestens etwa 5 und bis zu etwa 30, 35, 40, 45 oder 50 Gew.-% herstellt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (b) gemäß Anspruch 10 den Kleister auf eine Temperatur im Bereich von Raumtemperatur, 50, 60 oder 70 bis 100 °C erwärmt oder erhitzt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (c) gemäß Anspruch 10
- (i) bei einer Temperatur im Bereich von 50 °C bis an den Gefrierpunkt, vorzugsweise 35 bis 15 °C, 27 bis 22 °C, 16 bis 0 °C oder 6 bis 2 °C und/oder
 - (ii) für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, vorzugsweise 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h retrogradiert.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (c) gemäß Anspruch 10 nach einem Temperaturstufenprogramm
- (i) in einem Temperaturbereich von 100 bis 0 °C und vorzugsweise 90 bis 4 °C
 - (ii) für ein Gesamtzeitintervall von 8 bis 36 h, vorzugsweise 20 bis 28 h und insbesondere 22 bis 26 h gemäß dem folgenden Temperatur-Zeit-Programm stufenweise und gegebenenfalls unter Einwirkung von Scherkräften abkühlt und retrogradiert, wobei sich die gewählten Zeitintervalle zu einem vorstehend angegebenen Gesamt-Zeitintervall ergänzen:

Temperatur-Zeit-Programm	
Temperatur (°C)	Zeitintervall
90 ± 10	5 min ± 5 min
80 ± 10	10 min ± 10 min
70 ± 10	(30 bis 180 min) ± 30
40 ± 10	(60 bis 180 min) ± 60 min
25 ± 10	22 h ± 15 h
4 ± 10	20 h ± 15 h

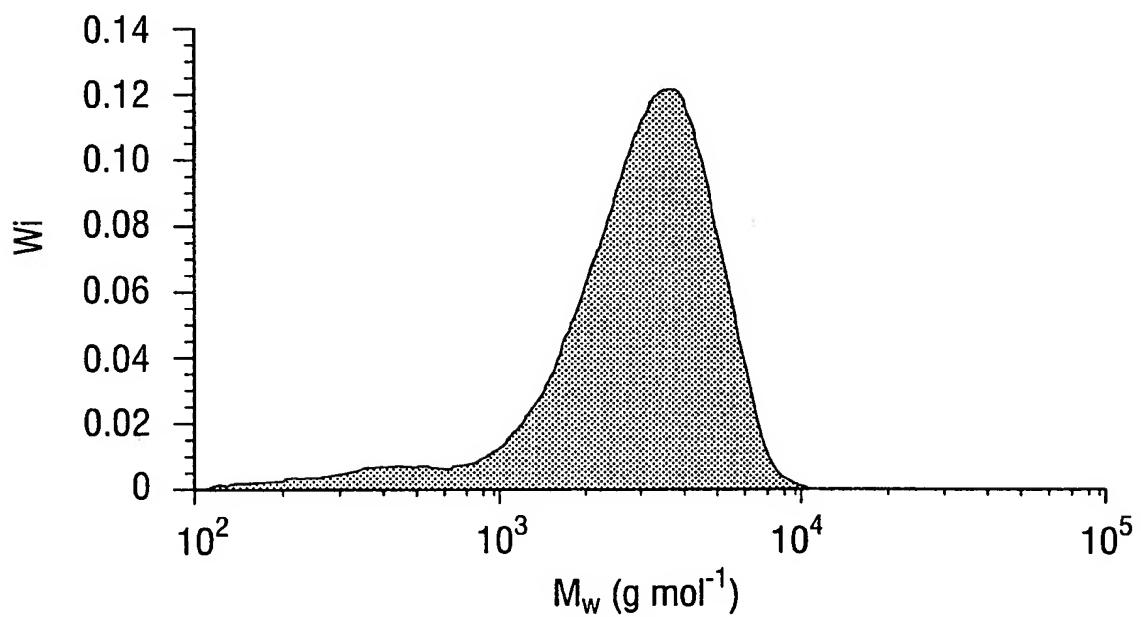
15. Verfahren zur Herstellung von α -Amylase-resistenten Polysacchariden mit hohem RS-Gehalt umfassend folgende Schritte:
- 5 a) Herstellung einer Suspension oder Dispersion aus wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukanen) und Wasser;
- b) Einfrieren der erhaltenen Suspension oder Dispersion;
- c) Retrogradation;
- d) Auftauen der nach Schritt (c) erhaltenen Masse; und
- 10 e) ggf. Trocknung oder Entwässerung der nach Schritt (d) erhaltenen Masse.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man die gemäß Schritt (d) aufgetaute Masse noch einmal oder mehrmals den Schritten (b) bis (d) unterwirft, bevor man endgültig auftaut, trocknet oder entwässert.
- 15
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (b) gemäß Anspruch 15 die erhaltene Suspension oder Dispersion auf eine Temperatur im Bereich 0 °C bis -80 °C abkühlt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (c) gemäß Anspruch 15 für ein Zeitintervall von 1 bis 72 h, bevorzugt 1 bis 36 h und insbesondere 15 bis 30 h retrogradiert.
- 5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Stufe (a) gemäß Anspruch 10 oder Anspruch 15 von Poly-(1,4- α -D-glukanen) ausgeht, die aus Biotransformation, aus Umsetzung mit Enzymen oder aus Umsetzung von Saccharose mit einem Enzym der enzymatischen Aktivität einer Amylosucrase gewonnen worden sind.
- 10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sind.
- 15 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) in 6-Position einen Verzweigungsgrad von höchstens 0,5 % aufweisen.
- 20 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) in 2- oder 3-Position einen Verzweigungsgrad von jeweils höchstens 1 % und insbesondere höchstens 0,5 % aufweisen.
- 25 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) ein Molekulargewicht von $0,75 \times$ bis 10^2 bis 10^7 , bevorzugt 10^3 bis 10^6 g/mol und bevorzugt von 10^3 bis 5×10^5 aufweisen.
- 30 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen Poly-(1,4- α -D-glukane) weder entzweigt, insbesondere weder enzymatisch entzweigt, noch hinsichtlich ihrer Kettenlänge (und damit

hinsichtlich ihres Molekulargewichts) reduziert worden sind, insbesondere nicht durch Enzymkatalyse, Säurekatalyse, Extrusion, Oxidation oder Pyrolyse.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man α -Amylase-resistente Polysaccharide mit einem RS-Gehalt von mindestens 65 Gew.-% gewinnt.
5
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Schritt (e) gemäß Anspruch 10 oder bei Schritt (d) gemäß Anspruch 11 das retrogradierte Produkt durch Sprüh- oder Gefriertrocknung trocknet.
10
27. Verwendung eines α -Amylase-resistenten Polysaccharids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 für Lebensmittel-Vorprodukte oder Lebensmittel.
15
28. Verwendung eines α -Amylase-resistenten Polysaccharids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 als Lebensmitteladditiv oder Lebensmittelzusatzstoff.
20
29. Lebensmittel-Vorprodukt oder Lebensmittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem α -Amylase-resistenten Polysaccharid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.

Fig. 1 GPC - Chromatogramm des Poly-(1,4- α -D-glukans)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/04129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C08B30/12 C08B37/00 A23L1/308

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 98 54973 A (KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 10 December 1998 (1998-12-10) claims; table V ---	1,3
A	WO 90 15147 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION INC.) 13 December 1990 (1990-12-13) page 13; example 1 figure 11 ---	10-13
A	EP 0 564 893 A (NATIONALSTARCH AND CHEMICAL INVESTMENT HOLDING CORPORATION) 13 October 1993 (1993-10-13) cited in the application --- -/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 1999

Date of mailing of the international search report

04/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr nal Application No
PCT/EP 99/04129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 31553 A (INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 23 November 1995 (1995-11-23) cited in the application -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/04129

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9854973	A	10-12-1998	US	5855946 A	05-01-1999
			AU	7697798 A	21-12-1998
WO 9015147	A	13-12-1990	AU	5817590 A	07-01-1991
EP 564893	A	13-10-1993	US	5281276 A	25-01-1994
			US	5409542 A	25-04-1995
			CA	2092009 A,C	26-09-1993
			JP	1967936 C	18-09-1995
			JP	6009705 A	18-01-1994
			JP	6094481 B	24-11-1995
WO 9531553	A	23-11-1995	DE	4417879 A	23-11-1995
			DE	4447388 A	27-06-1996
			AU	699552 B	10-12-1998
			AU	2614195 A	05-12-1995
			CA	2190149 A	23-11-1995
			EP	0759993 A	05-03-1997
			HU	76087 A	30-06-1997
			JP	10500297 T	13-01-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04129

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C08B30/12 C08B37/00 A23L1/308

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C08B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, A	WO 98 54973 A (KANSAS STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 10. Dezember 1998 (1998-12-10) Ansprüche; Tabelle V ---	1,3
A	WO 90 15147 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION INC.) 13. Dezember 1990 (1990-12-13) Seite 13; Beispiel 1 Abbildung 11 ---	10-13
A	EP 0 564 893 A (NATIONALSTARCH AND CHEMICAL INVESTMENT HOLDING CORPORATION) 13. Oktober 1993 (1993-10-13) in der Anmeldung erwähnt ---	-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweitlaktiv erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25. Oktober 1999

04/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mazet, J-F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04129

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 31553 A (INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 23. November 1995 (1995-11-23) in der Anmeldung erwähnt -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Intern: **des Aktenzeichen**
PCT/EP 99/04129

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9854973	A	10-12-1998	US AU	5855946 A 7697798 A	05-01-1999 21-12-1998
WO 9015147	A	13-12-1990	AU	5817590 A	07-01-1991
EP 564893	A	13-10-1993	US US CA JP JP JP	5281276 A 5409542 A 2092009 A,C 1967936 C 6009705 A 6094481 B	25-01-1994 25-04-1995 26-09-1993 18-09-1995 18-01-1994 24-11-1995
WO 9531553	A	23-11-1995	DE DE AU AU CA EP HU JP	4417879 A 4447388 A 699552 B 2614195 A 2190149 A 0759993 A 76087 A 10500297 T	23-11-1995 27-06-1996 10-12-1998 05-12-1995 23-11-1995 05-03-1997 30-06-1997 13-01-1998